

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**(11)Publication number : 07-285999****(43)Date of publication of application : 31.10.1995****(51)Int.Cl.****C07K 16/04****C12N 15/02****C12P 21/08****G01N 33/02****G01N 33/53****G01N 33/577****// (C12P 21/08****C12R 1:91)****(21)Application number : 06-058974****(71)Applicant : PRIMA MEAT PACKERS LTD****(22)Date of filing : 29.03.1994****(72)Inventor : AKIMOTO MASANOBU****KURISAKI JUNICHI****MIZUMACHI ISAKO****TSUJI NORIKO****KANAI SATOSHI****(30)Priority****Priority number : 05 70595
06 28006****Priority date : 30.03.1993
25.02.1994****Priority country : JP
JP****(54) QUANTITATIVE ANALYSIS OF LACTOPROTEIN CONTENT IN FOOD BY
USING ELISA, MONOCLONAL ANTIBODY SELECTED FOR THE ANALYSIS AND
SELECTION OF THE MONOCLONAL ANTIBODY**

{MAASDISLLDA⁴⁸ I

{AQSAPLRVYVE⁴⁶ II

{EELKFTPEGDL⁵⁶ III

{EKT⁸⁶KIPAVPKID⁸⁶ IV

{⁹ALVRTPEYDD¹³³E¹³³ V

{⁹FNPTQLEEQ¹⁶²AN¹⁶² VI

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a monoclonal antibody capable of quantitatively analyzing lactoprotein in a food even after denaturation or decomposition by using a partial peptide of β -lactoglobulin as an antigen and selecting the antibody under a condition where it is combined with the antigen, the original protein and the reducing carboxymethylated substance.

CONSTITUTION: A partial peptide of β -lactoglobulin represented by formula I to VI is used as an antigen and combined with KLH of a carrier protein by using a binder such as glutalaldehyde to prepare a peptide-KLH conjugate material. This conjugate material is administrated together with an adjuvant to a BALB/c mouse to immunize the mouse therewith. After the final immunization, splenic cells are collected and a mouse myeloma cell is fused therewith. The fused cell is cultured in an HAT selection medium to obtain a hybridoma. Selection of the resultant hybridoma is then carried out under a condition where all the antigen peptide, β -lactoglobulin and the reducing carboxymethylated β -lactoglobulin can be combined and the positive clone is cultured, thus affording the objective new monoclonal antibody capable of quantitatively analyzing lactoprotein in a food without fail even when it is affected by thermal degeneration and degradation.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the monoclonal antibody sorted out the quantitative-analysis approach of the milk-proteins content in the food which used ELISA, and for [its] analysis, and the sorting approach of the monoclonal antibody.

[0002]

[Description of the Prior Art] Conventionally, ELISA (it considers as Following ELISA in the abbreviated name of Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) using an antigen-antibody reaction is known as the quantitative-analysis approach of the protein in food. Recently, the analysis kit by ELISA is created and marketed for soybean protein, casein, wheat gluten, and milk protein. In case quantitative analysis of milk protein is carried out, it is well-known to make into an index the beta lactoglobulin (for it to consider as beta-LG below) which is one of the milk protein.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Although the analysis kit by ELISA for beta-LG was already marketed, since the antibody currently used for the kit was a polyclonal antibody which uses beta-LG as an antigen, the quantitative analysis of the water solution of simple milk protein was not able to be used for the quantitative analysis of the milk protein blended into food even if possible. Moreover, in the production process of food, denaturation by heating, and when depolymerize processing which aimed at functional conversion was performed, by having used only beta-LG without denaturation as the antigen, beta-LG was blended into food and was not able to be used for the quantitative analysis of the milk protein which received heat treatment and functional conversion.

[0004] Even if this invention is the case where milk protein is influenced of heat denaturation or depolymerize, it aims at offering certainly the approach that quantitative analysis of the milk protein in food can be carried out. Moreover, since production and sorting of a monoclonal antibody with singularity serve as a conclusive factor when carrying out quantitative analysis of the milk protein in food by ELISA, it aims at offering the monoclonal antibody for the analysis, and the sorting approach of the monoclonal antibody collectively.

[0005]

[Means for Solving the Problem] Since the way which used the monoclonal antibody combines with an antigen alternatively compared with the case where a polyclonal antibody is used when carrying out quantitative analysis of the specific protein in food by ELISA, it is already known that the high results of precision can be achieved more.

[0006] For this reason, this invention person decided to compound the partial peptide equivalent to the molecule front face of beta-LG including the bending structure supposed that an antibody is easy to be recognized paying attention to the spacial configuration of beta-LG. However, all cysteines were permuted by the alanine and compounded. That is, it made it possible to analyze the existence of the milk protein in food by producing the monoclonal antibody which uses the partial peptide of a publication as an antigen to Table 1.

[0007]

表1

部分ペプチド番号 (仮称)	アミノ酸配列
LG3	22 36 LAMAASDISLLDAQS
LG4	32 46 LDAQSAPLRVYVEEL
LG5	42 56 YVEELKPTPEGDLEI
LG8	72 86 IAEKTKIPAVFKIDA
LG13	119 133 AQALVRTPEVDDEAL
LG16	149 162 LSFNPTQLERQABI

A: アラニン	M: メチオニン
C: システイン	N: アスパラギン
D: アスパラギン酸	P: プロリン
E: グルタミン酸	Q: グルタミン
F: フェニルアラニン	R: アルギニン
G: グリシン	S: セリン
H: ヒスチジン	T: トレオニン
I: イソロイシン	V: バリン
K: リジン	W: トリプトファン
L: ロイシン	Y: チロシン

this invention person chooses further the monoclonal antibody which carries out possible quantitative analysis of the milk protein in food, and came to be successful. That is, this invention is characterized by sorting out a monoclonal antibody according to the conditions which combine the partial peptide of beta-LG with antigen peptides, beta-LG, and all the beta lactoglobulins (it considers as RCM-ized beta-LG below) formed into reduction carboxymethyl from two or more monoclonal antibodies produced as an antigen. It is desirable to use what includes the field which the specific antibody of beta-LG of Table 1 combines as a partial peptide used as an antigen.

[0008] Moreover, using the monoclonal antibody concerned sorted out, this invention is Sandwiches ELISA or Inhibition ELISA, and is characterized by being the approach of carrying out quantitative analysis of the milk protein in food. Since the fixed antibody to which the anti-mouse IgG antibody which carried out enzyme labeling also to the mouse IgG fixed by solid phase in the case of the sandwiches ELISA which used two kinds of monoclonal antibodies will not react will also be measured, it is desirable to biotin-ize a second antibody.

[0009] Next, in order that this invention person might carry out quantitative analysis of the milk protein in food with a high precision, he contrasted the measured value of an actual milk protein content, and the theoretical value computed from the result of ELISA, and succeeded in choosing the most suitable monoclonal antibody. That is, this invention is made into the monoclonal antibody which was able to obtain the primary antibody from the partial peptide to 22 to 36 residue eye of the amino acid sequence of beta-LG, and is characterized by performing Sandwiches ELISA as what biotin-ized the monoclonal antibody which was able to obtain the second antibody from the partial peptide to 32 to 46 residue eye of the amino acid sequence of beta-LG.

[0010] Moreover, when performing Inhibition ELISA, it is characterized by using as an antibody the monoclonal antibody obtained from the partial peptide to the 119 to 133 residue eye of the amino acid sequence of beta-LG.

[0011]

[Function] The monoclonal antibody for the quantitative analyses of the milk protein in food sorted out as mentioned above can be used as an antibody for the quantitative analyses of the milk protein in food, even if it is the case where milk protein receives heat denaturation during manufacture of food, since it sorts out on condition that it combines not only with an antigen peptide but with both beta-LG and RCM-ized beta-LG.

[0012] Moreover, the optimal monoclonal antibody can be chosen to beta-LG which received depolymerize processing by adding the conditions reacted to beta-LG which received depolymerize processing to the conditions of antibody sorting.

[0013]

[Example 1] Hereafter, an example indicates the sorting approach of the monoclonal antibody for the quantitative analyses of the milk protein in the food using ELISA of this invention. According to the amino acid sequence of Table 1, the peptide used for an antigen compounded

by the solid phase technique, and performed purification by the gel filtration. Peptide-KLH complex was produced for the mole ratio of a peptide and KLH by 30:1 by using KLH as a carrier using the glutaraldehyde of 20 millimol. The solution was produced for peptide-KLH complex 0.1% with the phosphate buffer solution (it is called Following PBS) or physiological saline of pH7.2, the perfect AJU band and emulsion of FUROINDO were produced, immunity of the first time by intraperitoneal injection was performed, spacing for 21 more days was set and immunity was performed several times by the emulsion with the imperfect AJU band of FUROINDO. Furthermore, in order to perform sufficient antigen stimulus, three - four days before taking out a spleen cell, the vein was injected with 50micro of peptide-KLH complex g with the physiological saline. In addition, in this invention, although the BALB/c mouse was used altogether, the mouse of other systems can also be used.

[0014] The mouse myeloma cell (henceforth myeloma) used for cell fusion by this invention is a 8-azaguanine resistant strain, and cannot be grown in a HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine) selective medium. Myeloma was cultivated in the RPMI-1640 culture medium containing penicillin 100 unit / ml, streptomycin 100microg/ml, sodium-hydrogencarbonate 2 g/L, 10% fetal calf serum (it is called Following FCS), and 8-azaguanine 100microM.

[0015] The spleen was taken out in sterile, a mesh was passed by RPMI-1640 culture medium of a non-blood serum, and spleen cell suspension was adjusted. It washed twice by RPMI-1640 culture medium, and re-suspended in RPMI-1640 culture medium. As for the prepared spleen cell and myeloma, it was desirable to perform cell fusion among mixing ratios 20:1-2:1, and they were performed by 10:1 this time. A spleen cell and myeloma were suspended in nothing blood serum RPMI-1640 by the ratio of 10:1, and centrifugal processing for 10 minutes was performed. After removing a supernatant liquid culture medium, 1ml (pH 7-8) of 45% polyethylene-glycol solutions of a mean molecular weight 3350 was dropped at the cell used as a pellet, and 37 degrees C was maintained. In addition, the polyethylene glycol of mean molecular weights 1000-4000 was used for the fusion accelerator. While non-blood serum RPMI-1640 culture medium was slowly dropped at what added the polyethylene glycol, in addition, it re-suspended.

Centrifugal processing for 10 minutes was performed for this suspension, it re-suspended after removing supernatant liquid in the RPMI-1640 culture medium (henceforth the culture medium for hybridomas) containing penicillin 100 unit / ml, streptomycin 100microg/ml, sodium-hydrogencarbonate 2 g/L, 10%FCS, and 2-mercaptoethanol 40microM, every 1ml per one well was poured distributively on 24 well plate, and it cultivated by CO2 5% at 37 degrees C.

[0016] 1ml per one well of culture media added so that it might become a culture medium for hybridomas on the next day [of cell fusion] with hypoxanthine 100microM, aminopterin 0.4microM, and thymidine 16microM (henceforth a HAT selective medium) was added. Henceforth, at intervals of two days, the HAT selective medium was exchanged and the culture medium of the amount of one half was newly cultivated. In addition, the well of only myeloma was set up and it checked that myeloma became extinct by exchange of a HAT selective medium in the meantime.

[0017] Next, observation under a microscope was performed, the culture supernatant in the container with which the hybridoma was checked was extracted, and ELISA which fixed a peptide, beta-LG, or RCM-ized beta-LG according to the individual, respectively investigated the existence of an antibody production.

[0018] From the well which the hybridoma which is producing the target antibody is growing, cloning of a hybridoma was performed by the limiting dilution which used thymocyte of a mouse as the feeder cell. That is, it diluted so that 0.9 cells per one well of 96 well microtiter plate

might enter, and it cultivated by the culture medium for hybridomas. It checked under the microscope that it was a single colony certainly, the existence of an antibody production was investigated about the culture supernatant, the colony which is producing the antibody combined with a peptide, beta-LG, and RCM-ized beta-LG was increased, it was established as a cloning antibody production hybridoma, and the part was saved in liquid nitrogen after slow freezing.

[0019] In order to extract a monoclonal antibody in large quantities than ascites, the mouse pretreated by the imperfect AJU band or pristane of FUROINDO one week before intraperitoneal injection was injected with 2 million-10 million hybridomas. Ascites was extracted after about two weeks and the protein A column refined the antibody. ELISA investigated the refined class and refined subclass of a monoclonal antibody.

[0020] Moreover, about each partial peptide indicated to Table 1, the peptide of 8 residue or the die length not more than it was compounded so that 1 residue might overlap at a time, and limitation-ization of the part which each monoclonal antibody recognizes was performed. These results are shown in Table 2.

[0021]

表 2

部分ペプチド番号 (仮称)	モノクローナル抗体名 (仮称)	クラス	認識部位
LG3	LG3.2	IgG1 κ	DISLLDAQ
LG4	LG4.1	IgG1 κ	QSAPLRVY
LG5	LG5.2	IgG1 κ	LKPTPEGD
LG8	LG8.2	IgG1 κ	IPAVFKID
LG13	LG13.1	IgG2b κ	LVRTPEV
LG16	LG16.1	IgA κ	EQAH I

[0022]

[Example 2] Hereafter, an example explains the sorting approach of the monoclonal antibody suitable for the quantitative analysis of the milk protein in the food using the sandwiches ELISA of this invention. In order that the anti-mouse IgG antibody which carried out enzyme labeling also to the mouse IgG fixed by solid phase in the case of the sandwiches ELISA which used two kinds of mouse monoclonal antibodies might react and might also measure the fixed antibody, we biotin-ized the second antibody and decided to perform the sandwiches ELISA using avidin-enzyme complex. A NHS-biotin and each purification monoclonal antibody were made to react, and the biotin labelled antibody was produced.

[0023] LG3.2, LG4.1, LG5.2, LG8.2, and LG13.1 were fixed on 96 well microtiter plate, respectively, and LG3.2, LG4.1, LG5.2, LG8.2, and LG13.1 which were biotin-ized were used for Sandwiches ELISA as a second antibody. After Sandwiches ELISA performed 100 degrees C and denaturation for 60 minutes in the Tris-HCl buffer solution (it is called pH8.6 and Following TB) of 0.05M which added 10M urea and 2-mercaptoethanol for commercial milk protein (it is called a HOE protein concentrate and Following WPC) 2.7%, they diluted with PBS (it is called Following PBST) which contains Tween20 0.5%, and used what was used as the antigen solution. Avidin-alkaline phosphatase was used for avidin-enzyme complex.

[0024] Consequently, two kinds of combination, the biotin-izing LG 4.1 of the LG3.2 and the second antibody of a fixed antibody or the biotin-izing LG 4.1 of the LG8.2 and the second

antibody of a fixed antibody, was chosen from 20 kinds of combination. furthermore, about the combination of LG3.2 and the biotin-izing LG4.1 and LG8.2 which were elected, and the biotin-izing LG 4.1 In TB which produced the heating gel of WPC 10% and added 10M urea and 2-mercaptoethanol to WPC and coincidence of fine particles 2.7%, 100 degrees C, After performing solubilization denaturation for 60 minutes, it diluted with PBST, it prepared so that it might become 0.004% of WPC concentration, and the dilution phase was respectively produced from the solution this 0.004%, and the sandwiches ELISA which made these the antigen solution were performed.

[0025] Consequently, the absorption curve of the dilution stage prepared from heating WPC gel 10% and the dilution stage prepared from WPC of fine particles was mostly in agreement in the combination of LG3.2 and the biotin-izing LG 4.1. However, in the combination of LG8.2 and the biotin-izing LG 4.1, the absorption curve was not in agreement and the combination of LG3.2 and the biotin-izing LG 4.1 was chosen as the sandwiches ELISA of WPC.

[0026]

[Example 3] Hereafter, an example explains the quantitative-analysis approach of the milk protein in the food using the inhibition ELISA of this invention. Five antibodies of LG3.2, LG4.1, LG5.2, LG8.2, and LG13.1 which were produced in this invention were offered as a sample, 100 degrees C and WPC which performed denaturation for 60 minutes were fixed in TB which added 10M urea and 2-mercaptoethanol 2.7%, and reactivity was investigated. Consequently, although each of five antibodies often reacted to the fixed denaturation WPC, especially reactivity chose three good antibodies of LG3.2, LG4.1, and LG13.1.

[0027] The WPC2% addition model sausage was solubilized by the urea and 2-mercaptoethanol, and was diluted with PBST 400 times and 2000 times. On the other hand, WPC was dissolved by the urea and 2-mercaptoethanol of tales doses, it diluted with PBST, the solution was produced 0.1%, 5 times as many phase dilution as this was performed, and it considered as the calibration curve. Consequently, in the dilution range of a model sausage, the curve of the dilution stage of LG4.1 could not be approximated to a straight line, and was not able to be used. About LG3.2 and LG13.1, since the straight line was resembled, when the absorbance of a model sausage was applied to each calibration curve and calculated, it became Table 3.

[0028]

表3

モノクローナル抗体	サンプル希釈倍率	理論濃度 (%)	測定濃度 (%)	WPC量 (%)
LG3.2	400	0.005	0.0101	4.03
	2000	0.001	0.0011	2.27
LG13.1	400	0.005	0.0057	2.27
	2000	0.001	0.00098	1.93

Moreover, in one about 400 times the dilution ratio of this, the model sausage whose content of WPC is 0.5 - 5.0% is produced, and the result which carried out quantitative analysis by Inhibition ELISA by making LG13.1 into an antibody is shown in Table 4.

[0029]

表4

モデルソー セージ	サンプル 希釈倍率	理論濃度 (%)	測定濃度 (%)	WPC量 (%)	標準偏差
WPC0.5%	400.9	0.0013	0.0017	0.67	0.12
WPC1.0%	400.2	0.0025	0.0027	1.09	0.10
WPC2.0%	399.1	0.0050	0.0058	2.31	0.09
WPC5.0%	399.8	0.0125	0.0121	4.86	0.17

In the case of Inhibition ELISA, when LG13.1 carried out qualitative quantitative analysis of beta-LG in a meat product, it became clear that it is a very effective monoclonal antibody.

[0030]

[Example 4] Next, the example using different food is shown. it becomes water, salt, and the object that mixed starch with 0.5 and 1.0 or 2.0% in last at frozen SURIMI -- as -- WPC -- adding -- a silent cutter -- boiled fish paste -- the ground was produced and model boiled fish paste was produced with 85 degrees C and heating for 40 minutes. Based on the above-mentioned model sausage, solubilization denaturation processing was performed that quantitative analysis of the WPC in the produced model boiled fish paste should be carried out. The inhibition ELISA using LG13.1 sorted out with the model sausage about the diluted model boiled fish paste was performed. The result is shown in Table 5.

[0031]

表5

モデル鰯 鱈	サンプル 希釈倍率	理論濃度 (%)	測定濃度 (%)	WPC量 (%)	標準偏差
WPC0.5%	393.8	0.0013	0.0013	0.52	0.05
WPC1.0%	400.1	0.0025	0.0026	1.03	0.08
WPC2.0%	398.0	0.0051	0.0053	2.11	0.27

By the above result, LG13.1 became clear [that it may be used very effective in the qualitative quantitative analysis of WPC used not only for a meat product but for fishery boiled fish paste].

[0032]

[Example 5] Next, the example using further different food is shown. To the yolk, WPC was added to salad oil, vinegar, and the object that mixed salt so that it might become 0.5 and 1.0 or 2.0% in last, and model mayonnaise was produced. The following processings were performed that quantitative analysis of the WPC in the produced model mayonnaise should be carried out. That is, since mayonnaise is the food of an emulsion system, destruction of an emulsion and cleaning are needed. Then, 3 ***** of PBST(s) heated at 60 degrees C to the model mayonnaise 1 produced section were agitated, and it incubated for 15 minutes at 60 degrees C further. This time amount and temperature can be freely chosen according to existence, such as emulsion stabilizer added by target mayonnaise, and a class. Centrifugal separation actuation is performed after incubation, and the cream layer formed in the upper layer is removed, and the volume of a water layer is set by PBST. Henceforth, like a model sausage and model boiled fish paste, solubilization denaturation and dilution were performed by the urea and 2-mercaptoethanol, and the inhibition ELISA using LG13.1 was performed. The result is shown in Table 6.

[0033]

表6

モデル マヨネーズ	サンプル 希釈倍率	理論濃度 (%)	測定濃度 (%)	WPC量 (%)	標準偏差
WPC0.5%	388.1	0.0013	0.0011	0.47	0.08
WPC1.0%	402.4	0.0025	0.0028	1.13	0.16
WPC2.0%	389.4	0.0050	0.0048	1.97	0.08

By the above result, LG13.1 became clear [that it may be used very effective in the qualitative quantitative analysis of WPC also in the food of an emulsion system like mayonnaise which was able to add WPC not only a gelled solid food article like a meat product or fishery boiled fish paste but for the purpose of emulsification stability].

[0034]

[Effect of the Invention] If it is in this invention so that clearly from the above explanation, it is effective in next enumerating.

1. Since the monoclonal antibody sorted out as mentioned above was sorted out on condition that it combined not only with an antigen peptide but with both beta-LG and RCM-ized beta-LG, even if it was the case where milk protein received heat denaturation during manufacture of food, it could be used as an antibody for the quantitative analyses of the milk protein in food, and analysis of milk protein with a precision higher than before of it was attained.
2. In the case of Sandwiches ELISA, since the combination of LG3.2 and the biotin-izing LG 4.1 was a monoclonal antibody very useful when LG13.1 carries out qualitative quantitative analysis of beta-LG, when it used these monoclonal antibodies in the case of Inhibition ELISA, the quantitative analysis of the milk protein in the food which was not made conventionally became possible.
3. Moreover, by adding the conditions reacted to beta-LG which received depolymerize processing to the conditions of antibody sorting, the optimal monoclonal antibody could be chosen to beta-LG which received depolymerize processing, and even if it was the case where the milk protein in food was influenced of depolymerize, it became certainly possible to carry out quantitative analysis of the milk protein in food.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The sorting approach of the monoclonal antibody for the quantitative analyses of the milk protein in food characterized by sorting out according to the conditions which combine the partial peptide of a beta lactoglobulin with antigen peptides, beta lactoglobulins, and all the beta lactoglobulins formed into reduction carboxymethyl out of the monoclonal antibody produced from two or more cloning hybridomas obtained as an antigen.

[Claim 2] The amino acid sequence of an antigen peptide,

22 36
LAMAASDISLLDAQS

32 46
LDAQSAPLRVYVEEL

42 56
YVEELKPTPEGDLI

72 86
IAEKTIPAVFKIDA

119 133
AQALVRTPEVDDEAL

149 162
LSFNPTQLEEQAHY

The sorting approach of the monoclonal antibody of claim 1 characterized by limiting to six kinds of **.

[Claim 3] The monoclonal antibody sorted out by the sorting approach of claim 1.

[Claim 4] The quantitative-analysis approach of the milk protein in food which makes a primary antibody one of the monoclonal antibodies of claim 3, biotin-izes one of the monoclonal antibodies of claim 3, considers as a second antibody, and is characterized by performing Sandwiches ELISA.

[Claim 5] The quantitative-analysis approach of the milk protein in the food of claim 4 characterized by for a primary antibody being a monoclonal antibody obtained from the partial peptide to 22 to 36 residue eye of the amino acid sequence of a beta lactoglobulin, and biotin-izing the monoclonal antibody by which the second antibody was obtained from the partial peptide to 32 to 46 residue eye of the amino acid sequence of a beta lactoglobulin.

[Claim 6] The quantitative-analysis approach of the milk protein in food characterized by performing Inhibition ELISA by the monoclonal antibody of claim 3.

[Claim 7] The quantitative-analysis approach of the milk protein in the food of claim 6 characterized by an antibody being a monoclonal antibody obtained from the partial peptide to the 119 to 133 residue eye of the amino acid sequence of a beta lactoglobulin.

[Claim 8] The sorting approach of the monoclonal antibody for the quantitative analyses of the milk protein in food characterized by adding the conditions reacted to the beta lactoglobulin which received depolymerize processing to the sorting conditions of claim 1.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-285999

(43) 公開日 平成7年(1995)10月31日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 16/04		8318-4H		
C 1 2 N 15/02	Z N A			
C 1 2 P 21/08		9161-4B		
G 0 1 N 33/02		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A C

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-58974	(71) 出願人	000113067 プリマハム株式会社 東京都千代田区蔵が関3丁目2番5号
(22) 出願日	平成6年(1994)3月29日	(72) 発明者	秋元 政信 茨城県土浦市中向原636番地 プリマハム株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願平5-70595	(72) 発明者	栗崎 純一 茨城県つくば市吾妻4-12-111-301
(32) 優先日	平5(1993)3月30日	(72) 発明者	水町 功子 茨城県つくば市大字稲岡495番地の82
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	辻 典子 茨城県土浦市荒川沖西区3丁目161番地の20
(31) 優先権主張番号	特願平6-28006		
(32) 優先日	平6(1994)2月25日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E L I S A を用いた食品中の乳蛋白質含量の定量分析方法及びその分析用に選別されたモノクローナル抗体及びそのモノクローナル抗体の選別方法

(57) 【要約】

【目的】 乳蛋白質が加熱変性や低分子化の影響を受けた場合であっても確実に、食品中の乳蛋白質の定量分析を行い得る方法を提供すること。

【構成】 β -ラクトグロブリンの部分ペプチドを抗原として得られた複数のクローン化ハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体の中から、抗原ペプチドと β -ラクトグロブリンと還元カルボキシメチル化した β -ラクトグロブリンの全てに結合するモノクローナル抗体を選別し、E L I S A を用いて食品中の乳蛋白質の定量分析を行う。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 β -ラクトグロブリンの部分ペプチドを抗原として得られた複数のクローン化ハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体の中から、抗原ペプチドと β -ラクトグロブリンと還元カルボキシメチル化した β -ラクトグロブリンの全てに結合する条件により選別することを特徴とする、食品中の乳蛋白質の定量分析用のモノクローナル抗体の選別方法。

【請求項2】抗原ペプチドのアミノ酸配列を、

22 36
L A M A A S D I S L L D A Q S
32 46
L D A Q S A P L R V Y V E E L
42 56
Y V E E L K P T P E G D L E Y
72 86
I A E K T K I P A V F K I D A
119 133
A Q A L V R T P E V D D E A L
149 162
L S P N P T Q L E E Q A H Y

の6種類に限定することを特徴とする請求項1のモノクローナル抗体の選別方法。

【請求項3】請求項1の選別方法により選別されるモノクローナル抗体。

【請求項4】請求項3のモノクローナル抗体の1つを一次抗体とし、請求項3のモノクローナル抗体の1つをビオチン化して二次抗体とし、サンドイッチELISAを行うことを特徴とする、食品中の乳蛋白質の定量分析方法。

【請求項5】一次抗体が β -ラクトグロブリンのアミノ酸配列の22から36残基目までの部分ペプチドから得られたモノクローナル抗体であり、二次抗体が β -ラクトグロブリンのアミノ酸配列の32から46残基目までの部分ペプチドから得られたモノクローナル抗体をビオチン化したものであることを特徴とする請求項4の食品中の乳蛋白質の定量分析方法。

【請求項6】請求項3のモノクローナル抗体で、インヒビションELISAを行うことを特徴とする、食品中の乳蛋白質の定量分析方法。

【請求項7】抗体が β -ラクトグロブリンのアミノ酸配列の119から133残基目までの部分ペプチドから得られたモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項6の食品中の乳蛋白質の定量分析方法。

【請求項8】請求項1の選別条件に、低分子化処理を受けた β -ラクトグロブリンに反応する条件を加えることを特徴とする、食品中の乳蛋白質の定量分析用のモノクローナル抗体の選別方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

2

【産業上の利用分野】本発明は、ELISAを用いた食品中の牛乳蛋白質含量の定量分析方法及びその分析用に選別されたモノクローナル抗体及びそのモノクローナル抗体の選別方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来、食品中の蛋白質の定量分析方法として、抗原抗体反応を利用したELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) の略称で以下ELISAとする) が知られている。最近、ELISAによる分析キットが、大豆蛋白質、カゼイン、小麦グルテン、乳蛋白質を対象として作成され、市販されている。乳蛋白質の定量分析をする際、乳蛋白質の1つである β -ラクトグロブリン (以下 β -LGとする) を指標とすることは公知である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 β -LGを対象としたELISAによる分析キットは既に市販されているが、キットに使用されている抗体が、 β -LGを抗原とするポリクローナル抗体であるために、単純な乳蛋白質の水溶液の定量分析は可能であっても、食品中に配合された乳蛋白質の定量分析には利用できなかった。また、食品の製造工程において、 β -LGは、加熱による変性や、機能性変換を目指した低分子化処理が行われた場合、変性のない β -LGのみを抗原としたのでは、食品中に配合され、熱処理や機能性変換を受けた乳蛋白質の定量分析には利用できなかった。

【0004】本発明は、乳蛋白質が加熱変性や低分子化の影響を受けた場合であっても確実に、食品中の乳蛋白質の定量分析を行い得る方法を提供することを目的とする。また、食品中の乳蛋白質の定量分析をELISAで行う場合に、特異性のあるモノクローナル抗体の作製と選別が決め手となるため、その分析用のモノクローナル抗体及びそのモノクローナル抗体の選別方法を併せて提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】ELISAにより食品中の特定の蛋白質を定量分析する場合に、モノクローナル抗体を用いたほうが、ポリクローナル抗体を用いた場合に比べて、選択的に抗原と結合するので、より精度の高い結果を出し得ることは既に知られている。

【0006】このため、本発明者は、 β -LGの立体構造に着目し、抗体に認識されやすいとされている折れ曲がり構造を含む β -LGの分子表面に相当する部分ペプチドを合成することとした。但し、システインは全てアラニンに置換し合成した。すなわち、表1に記載の部分ペプチドを抗原とするモノクローナル抗体を作製することにより、食品中の乳蛋白質の有無を分析することを可能とした。

【0007】

3
表1

部分ペプチド番号 (残基)	アミノ酸配列
LG3	22 36 LAMAASDISLLDAQ8
LG4	32 46 LDAQSAPLRVYVEEL
LG5	42 56 YVBELKPTPEGDLLEI
LG8	72 86 IAEKT KIPAVFKIDA
LG13	119 133 AQALVRTPEVDDEAL
LG16	149 162 LSFNPQTQLEEQAH1

A: アラニン
C: シスチニン
D: アスパラギン酸
E: グルタミン酸
F: フェニルアラニン
G: グリシン
H: ヒスチジン
I: イソロイシン
K: リジン
L: ロイシン

M: メチオニン
N: アスパラギン
P: プロリン
Q: グルタミン
R: アルギニン
S: セリン
T: トレオニン
V: バリン
W: トリプトファン
Y: チロシン

本発明者は、更に、食品中の乳蛋白質の定量分析を可能とするモノクローナル抗体の選択を行い、成功するに至った。すなわち、本発明は、 β -LGの部分ペプチドを抗原として産生される複数のモノクローナル抗体から、抗原ペプチドと β -LGと還元カルボキシメチル化した β -ラクトグロブリン（以下RCM化 β -LGとする）の全てに結合する条件によりモノクローナル抗体を選別することを特徴とする。抗原とする部分ペプチドとして、表1の β -LGの特異抗体が結合する領域を含むものを利用することが望ましい。

【0008】また、本発明は、選別された当該モノクローナル抗体を用いて、サンドイッチELISA若しくはインヒビションELISAで、食品中の乳蛋白質の定量分析を行う方法であることを特徴とする。2種類のモノクローナル抗体を使用したサンドイッチELISAの場合、固相に固定化されたマウスIgGに対しても酵素標識をした抗マウスIgG抗体が反応していまい、固定化された抗体をも測定することになってしまうため、二次抗体をビオチン化することが望ましい。

【0009】次に、本発明者は、精度の高い食品中の乳蛋白質の定量分析を実現するため、実際の乳蛋白質含量の測定値と、ELISAの結果から算出される理論値を対比し、最も適したモノクローナル抗体を選択することに成功した。すなわち、本発明は、一次抗体を β -LGのアミノ酸配列の22から36残基目までの部分ペプチドから得られたモノクローナル抗体とし、二次抗体を β -LGのアミノ酸配列の32から46残基目までの部分ペプチドから得られたモノクローナル抗体をビオチン化

したものとて、サンドイッチELISAを行うことを特徴とする。

【0010】また、インヒビションELISAを行う場合は、 β -LGのアミノ酸配列の119から133残基目までの部分ペプチドから得られたモノクローナル抗体を抗体として用いることを特徴とする。

【0011】

【作用】上記のように選別された、食品中の乳蛋白質の定量分析用のモノクローナル抗体は、抗原ペプチドばかりでなく、 β -LGとRCM化 β -LGの両方にも結合することを条件に選別されるので、食品の製造中に乳蛋白質が加熱変性を受けた場合であっても、食品中の乳蛋白質の定量分析用の抗体として利用することができる。

【0012】また、低分子化処理を受けた β -LGに反応する条件を抗体選別の条件に加えることにより、低分子化処理を受けた β -LGに対し最適なモノクローナル抗体を選択できる。

【0013】

【実施例1】以下、実施例により、本発明のELISAを用いた食品中の乳蛋白質の定量分析用のモノクローナル抗体の選別方法を記載する。抗原に用いるペプチドは、表1のアミノ酸配列に従い、固相法により合成し、グルトによる精製を行った。KLHをキャリアーとして、ペプチドとKLHのモル比を30:1で、20ミリモルのグルタルアルデヒドを用いて、ペプチド-KLH複合体を作製した。ペプチド-KLH複合体をpH7.2のリン酸緩衝液（以下PBSという）あるいは生理食塩水で0.1%溶液を作製し、フロインドの完全アジュバンドとエマルジョンを作製し、腹腔内注射による初回の免疫を行い、更に21日間の間隔をおいて、フロインドの不完全アジュバンドとのエマルジョンで数回免疫を行った。更に、充分な抗原刺激を行うために、脾臓細胞を取り出す3~4日前に、ペプチド-KLH複合体50 μ gを生理食塩水と共に静脈に注射した。尚、本発明では、全てBALB/cマウスを使用した。他の系のマウスでも使用できる。

【0014】本発明で細胞融合に用いたマウス骨髓腫細胞（以下ミエローマという）は、8-アザグアニン耐性株であって、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選択培地中では、生育できない。ミエローマは、ペニシリン100ユニット/ml、ストレプトマイシン100μg/ml、炭酸水素ナトリウム2g/L、10%牛胎児血清（以下FCSという）及び8-アザグアニン100μMを含むRPMI-1640培地中で培養した。

【0015】脾臓を無菌的に取り出し、無血清のRPMI-1640培地でメッシュを通過させ、脾臓細胞懸濁液を調整した。RPMI-1640培地で2回洗浄し、RPMI-1640培地に再懸濁した。調整した脾臓細胞とミエローマは、混合比20:1~2:1の間で細胞融合を行うことが望ましく、今回は10:1で行った。脾臓細胞とミエローマを10:1の比率で無血清RPMI-1640に懸濁し、10分間の遠心処理を行った。上清培地を除去した後、ペレットとなった細胞に平均分子量3350の45%ポリエチレングリコール溶液（pH7~8）1mlを滴下し、37℃を保った。尚、融合促進剤は、平均分子量1000~4000のポリエチレングリコールを使用した。ポリエチレングリコールを加えたものに、無血清RPMI-1640培地をゆっくり滴下しながら加え、再懸濁した。この懸濁液を10分間の遠心処理を行い、上清を除去後、ペニシリン100ユニット/ml、ストレプトマイシン100μg/ml、炭酸水素ナトリウム2g/L、10%FCS及び2-メルカプトエタノール40μMを含むRPMI-1640培地（以下ハイブリドーマ用培地という）中に再懸濁し、24ウェルプレートに1ウェル当たり1mlずつ分注し、37℃で5%CO₂で培養した。

【0016】細胞融合の翌日、ハイブリドーマ用培地にヒポキサンチン100μM、アミノプテリン0.4μM及びチミジン16μMとなるように加えた培地（以下HAT選択培地という）を1ウェル当たり1ml加えた。以*

*後、2日間隔で半分量の培地を新たにHAT選択培地に交換して培養した。尚、この間、ミエローマのみのウェルを設定し、HAT選択培地の交換によりミエローマが死滅するのを確認した。

【0017】次に、顕微鏡による観察を行い、ハイブリドーマが確認された容器中の培養上清を採取し、ペプチド、β-LGあるいはRCM化β-LGをそれぞれ個別に固定化したELISAにより抗体産生の有無を調べた。

【0018】目的の抗体を産生しているハイブリドーマが生育しているウェルより、マウスの胸腺細胞をフィーダー細胞とした限界希釈法により、ハイブリドーマのクローニングを行った。すなわち、96ウェルマイクロタイタープレートの1ウェル当たり、0.9個の細胞が入るように希釈し、ハイブリドーマ用培地で培養した。確実に単一コロニーであることを顕微鏡下で確認し、その培養上清について抗体産生の有無を調べ、ペプチド、β-LG及びRCM化β-LGと結合する抗体を産生しているコロニーを増殖し、クローン化抗体産生ハイブリドーマとして確立し、その一部を緩凍凍結後、液体窒素中で保存した。

【0019】モノクローナル抗体を腹水より大量に採取するために、腹腔内注射の1週間前にフロイドの不完全アジュバンドあるいはプリスタンで前処理したマウスに20万~1千万個のハイブリドーマを注射した。約2週間後に腹水を採取し、プロテインAカラムにより抗体の精製を行った。精製したモノクローナル抗体のクラスとサブクラスについてELISAにより調べた。

【0020】また、表1に記載した各部分ペプチドについて、1残基ずつオーバーラップするように8残基あるいはそれ以下の長さのペプチドを合成し、それぞれのモノクローナル抗体が認識している部分の限定化を行った。これらの結果を表2に示す。

【0021】

表2

部分ペプチド番号 (残基)	モノクローナル抗体名 (残基)	クラス	認識部位
LG3	LG3.2	IgG1 κ	DISLLDAQ
LG4	LG4.1	IgG1 κ	QSAPLRVY
LG5	LG5.2	IgG1 κ	LEPTPEGD
LG8	LG8.2	IgG1 κ	IPAVPKID
LG13	LG13.1	IgG2b κ	LVRTPEV
LG16	LG16.1	IgA κ	EQAH1

【0022】

【実施例2】以下、実施例により、本発明のサンドイッチELISAを用いた食品中の乳蛋白質の定量分析に適用するモノクローナル抗体の選別方法について説明する。

2種類のマウスモノクローナル抗体を使用したサンドイッチELISAの場合、固相に固定化されたマウスIgGに対しても酵素標識をした抗マウスIgG抗体が反応してしまい、固定化された抗体をも測定することになっ

てしまうため、二次抗体をビオチン化し、アビジン-酵素複合体を用いたサンドイッチELISAを行うこととした。NHS-ビオチンと各精製モノクローナル抗体を反応させ、ビオチン標識抗体を作製した。

【0023】サンドイッチELISAには、LG3、2、LG4、1、LG5、2、LG8、2及びLG13、1をそれぞれ96ウェルマイクロタイタープレートに固定化し、二次抗体として、ビオチン化したLG3、2、LG4、1、LG5、2、LG8、2及びLG13、1を用いた。サンドイッチELISAは、市販乳蛋白質（ホエープロテインコンセントレート、以下WPCという）を10M尿素及び2-メルカプトエタノールを2.7%加えた0.05MのTris-HCl緩衝液（pH8.6、以下TBという）中で100℃、60分間の変性を行った後、Tween20を0.5%含むPBS（以下PBSTという）で希釈し、抗原溶液としたものを用いた。アビジン-酵素複合体にはアビジン-アルカリフォスファターゼを用いた。

【0024】その結果、20通りの組み合わせの中から、固定化抗体のLG3、2と二次抗体のビオチン化LG4、1、あるいは、固定化抗体のLG8、2と二次抗体のビオチン化LG4、1の2通りの組合せが選ばれた。更に、選出されたLG3、2とビオチン化LG4、1、及びLG8、2とビオチン化LG4、1の組合せについて、10%WPCの加熱ゲルを作製し、粉体のWPCと同時に、10M尿素及び2-メルカプトエタノールを2.7%加えたTB中で100℃、60分間の可溶化変性を行った後、PBSTで希釈し、WPC濃度0.004%となるように調整し、この0.004%溶液より各々希釈段階を作製し、これらを抗原溶液としたサンドイッチELISAを行った。

*【0025】その結果、10%加熱WPCゲルより調製した希釈段と粉体のWPCより調製した希釈段の吸光度曲線は、LG3、2とビオチン化LG4、1の組合せではほぼ一致した。しかし、LG8、2とビオチン化LG4、1の組合せでは吸光度曲線は一致せず、WPCのサンドイッチELISAにはLG3、2とビオチン化LG4、1の組合せが選択された。

【0026】

【実施例3】以下、実施例により、本発明のインヒビションELISAを用いた食品中の乳蛋白質の定量分析方法について説明する。本発明の中で作製したLG3、2、LG4、1、LG5、2、LG8、2及びLG13、1の5抗体を試して、10M尿素及び2-メルカプトエタノールを2.7%加えたTB中で100℃、60分間の変性を行ったWPCを固定化し、反応性を調べた。その結果、5抗体は、いずれもよく固定化変性WPCに反応したが、特に反応性が良かったLG3、2、LG4、1及びLG13、1の3抗体を選択した。

【0027】WPC2%添加モデルソーセージを、尿素と2-メルカプトエタノールで可溶化し、PBSTで400倍、2000倍に希釈した。一方、WPCを同量の尿素と2-メルカプトエタノールで溶解し、PBSTで希釈し、0.1%溶液を作製し、5倍の段階希釈を行い検量線とした。その結果、LG4、1の希釈段の曲線は、モデルソーセージの希釈範囲で直線に近似できず使用できなかった。LG3、2とLG13、1については、直線に近似したため、モデルソーセージの吸光度を各々の検量線に当てはめ、計算したところ、表3になった。

【0028】

モノクローナル抗体	サンプル希釈倍率	理論濃度(%)	測定濃度(%)	WPC量(%)
LG8、2	400	0.005	0.0101	4.03
	2000	0.001	0.0011	2.27
LG13、1	400	0.005	0.0057	2.27
	2000	0.001	0.00096	1.93

また、約400倍の希釈率において、WPCの含有量が ※量分析した結果を表4に示す。

0.5~5.0%のモデルソーセージを作製し、LG13、1を抗体としてインヒビションELISAにより定

【0029】

モデルソーセージ	サンプル希釈倍率	理論濃度(%)	測定濃度(%)	WPC量(%)	相対偏差
WPC0.5%	400.9	0.0013	0.0017	0.67	0.12
WPC1.0%	400.2	0.0025	0.0027	1.09	0.10
WPC2.0%	399.1	0.0050	0.0058	2.81	0.09
WPC5.0%	399.8	0.0125	0.0121	4.86	0.17

インヒビションELISAの場合、食肉製品においてLG13、1がβ-LGの定性定量分析を行う上で極めて有効なモノクローナル抗体であることが明らかとなった。

【0030】

【実施例4】次に、異なる食品を用いた実施例を示す。冷凍スリミに、水、食塩、及び澱粉を混合した物に、最終で0.5、1.0、2.0%となるようにWPCを加

え、サイレントカッターで薄餅生地を作製し、85℃、40分の加熱によりモデル薄餅を作製した。作製したモデル薄餅中のWPCを定量分析すべく、前述のモデルソーセージに準拠し、可溶化変性処理を行った。希釈した*

*モデル薄餅についてモデルソーセージで選別されたLG13.1を用いたインヒビションELISAを行った。その結果を表5に示す。
[0031]

表5

モデル薄餅	サンプル 希釈倍率	理論濃度 (%)	測定濃度 (%)	WPC量 (%)	標準偏差
WPC0.5%	393.8	0.0013	0.0018	0.52	0.05
WPC1.0%	400.1	0.0025	0.0026	1.08	0.06
WPC2.0%	396.0	0.0051	0.0063	2.11	0.27

以上の結果により、LG13.1は、食肉製品のみならず、水産練り製品に使用されるWPCの定性定量分析に極めて有効に利用され得ることが明らかとなった。

[0032]

【実施例5】次に、更に異なる食品を用いた実施例を示す。卵黄に、サラダ油、酢、及び食塩を混合した物に、最終で0.5、1.0、2.0%となるようにWPCを加え、モデルマヨネーズを作製した。作製したモデルマヨネーズ中のWPCを定量分析すべく、以下の処理を行った。すなわち、マヨネーズはエマルジョン系の食品であるため、エマルジョンの破壊、脱脂が必要となる。そこで、作製したモデルマヨネーズ1部に対して60℃に加※

※熱したPBSTを3部加え攪拌し、さらに、60℃で15分間インキュベートした。この時間及び温度は、対象となるマヨネーズに添加される乳化安定剤などの有無、種類により自由に選ぶことができる。インキュベート後に、遠心分離操作を行い、上層に形成されるクリーム層を除去し、水層をPBSTで定容する。以降は、モデルソーセージ、モデル薄餅と同様、尿素及び2-メルカプトエタノールで可溶化変性、希釈を行い、LG13.1を用いたインヒビションELISAを行った。その結果を表6に示す。

[0033]

表6

モデル マヨネーズ	サンプル 希釈倍率	理論濃度 (%)	測定濃度 (%)	WPC量 (%)	標準偏差
WPC0.5%	398.1	0.0018	0.0011	0.47	0.08
WPC1.0%	402.4	0.0035	0.0028	1.13	0.16
WPC2.0%	399.4	0.0060	0.0049	1.97	0.08

以上の結果により、LG13.1は、食肉製品、あるいは水産練り製品の様な、ゲル化した固形食品のみならず、乳化安定を目的としてWPCを加えられたマヨネーズの様なエマルジョン系の食品においてもWPCの定性定量分析に極めて有効に利用され得ることが明らかとなった。

[0034]

【発明の効果】以上の説明から明らかなように、本発明にあっては、次に列挙するような効果がある。

1. 上記のように選別されたモノクローナル抗体は、抗原ペプチドばかりでなく、β-LGとRCM化β-LGの両方にも結合することを条件に選別されるので、食品の製造中に乳蛋白質が加熱変性を受けた場合であっても、食品中の乳蛋白質の定量分析用の抗体として利用することができ、従来より精度の高い乳蛋白質の分析が可

能となった。

2. サンドイッチELISAの場合にはLG3.2とビオチン化LG4.1の組合せが、インヒビションELISAの場合にはLG13.1が、β-LGの定性定量分析をする上で極めて有用なモノクローナル抗体であるので、これらのモノクローナル抗体を用いることにより、従来できなかった食品中の乳蛋白質の定量分析が可能となった。

3. また、低分子化処理を受けたβ-LGに反応する条件を抗体選別の条件に加えることにより、低分子化処理を受けたβ-LGに対し最適なモノクローナル抗体を選択でき、食品中の乳蛋白質が低分子化の影響を受けた場合であっても確実に、食品中の乳蛋白質の定量分析を行うことが可能となった。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
33/577

識別記号

D
B

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

(7)

特開平7-285999

//(C12P 21/08

C12R 1:91)

(72)発明者 金井 聡

茨城県土浦市中向原635番地 プリマハム

株式会社内